

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

6.31.14 11:51

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : 2 803 747

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 00 00573

⑤1 Int Cl⁷ : A 61 K 7/48, A 61 K 7/06, 35/78, 31/353, A 61 P 17/08,
17/14, 17/10

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 18.01.00.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 20.07.01 Bulletin 01/29.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : LABORATOIRES PHARMASCIENCE
Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : MSIKA PHILIPPE et PICCIRILLI
ANTOINE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 UTILISATION D'ISOFLAVONES ET/OU D'EXTRAITS DE PRUNIER D'AFRIQUE EN PHARMACIE,
COSMETIQUE ET EN TANT QU'ADDITIF ALIMENTAIRE.

⑤7 La présente invention se rapporte à l'utilisation d'au
moins un produit choisi dans le groupe constitué par les iso-
flavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de
ces derniers, pour la préparation d'une composition desti-
née à inhiber l'activité de la 5 α -réductase. Cette utilisation
permet d'obtenir un effet remarquable d'inhibition de l'activi-
té de la 5 α -réductase procurant ainsi une nouvelle réponse
pour le traitement des pathologies et/ ou désordres derma-
tologiques liés à une exagération congénitale ou acqui-
se de l'activité de la 5 α -réductase, notamment pour le
traitement de l'hypertrophie prostatique, de l'adénome pro-
statique, de l'acné, de l'hyperséborrhée, de l'alopécie et de
l'hirsutisme. L'invention se rapporte également à des mé-
thodes de traitement cosmétique, notamment de la peau
grasse, ainsi qu'à l'utilisation dudit produits décrits en tant
qu'additifs dans un aliment pour l'être humain et/ ou l'ani-
mal.

FR 2 803 747 - A1



5 La présente invention se rapporte à l'utilisation d'au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 α -réductase, notamment pour le traitement de l'hypertrophie prostatique, de l'adénome prostatique, de l'acné, de l'hyperséborrhée, de l'alopecie, 10 de l'hirsutisme.

L'invention se rapporte également à des méthodes de traitement cosmétique, notamment de la peau grasse, ainsi qu'à l'utilisation des produits décrits en tant qu'additifs dans un aliment pour l'être humain et/ou l'animal.

15 La 5 α -réductase est une enzyme microsomiale NADPH dépendante qui existe sous forme de deux isoenzymes synthétisées à partir de deux gènes différents.

L'isoenzyme de type 1 de la 5 α -réductase est retrouvée essentiellement dans le foie et la peau, plus particulièrement dans les glandes sébacées de la peau non génitale et du cuir chevelu, et apparaît à la puberté. L'isoenzyme de type 2 est prédominante dans la prostate et au niveau de la peau des territoires sexuels 20 différenciés : région génitale, barbe, et joue un rôle dans la différenciation sexuelle. La répartition des isoenzymes de type 1 et 2 de la 5 α -réductase au niveau de la peau et des annexes cutanées chez l'homme peut être illustrée par le tableau 1 ci-après.

Il existe un certain nombre de pathologies pour lesquelles une exagération congénitale ou acquise de l'activité de la 5 α -réductase est responsable en totalité ou 25 en majorité des troubles observés.

Par exemple, chez l'homme, cette enzyme 5 α -réductase, principalement localisée dans les tissus génitaux et dans la peau, catalyse l'hydroxylation de la testostérone en 5 α -réductase dihydrotestostérone (DHT). Or, comme la DHT est un androgène bien plus actif que la testostérone (environ 2 fois plus), les effets de cette 30 dernière sont amplifiés dans les tissus où est produite la DHT. Une activité trop élevée de la 5 α -réductase provoque ainsi des teneurs en androgène sous forme de

DHI trop élevées dans la prostate, d'où une surstimulation de cette dernière se traduisant en une croissance indésirable pouvant mener à la pathologie de l'hypertrophie prostatique, voire à l'adénome prostatique, nécessitant le plus souvent une intervention chirurgicale.

5

Tableau 1 : répartition des isoenzymes de type 1 et 2 de la 5 α -réductase au niveau de la peau et des annexes cutanées chez l'homme

		H5- α 1	H5- α 2
EPIDERME	Couche basale	++	+
	Couche spinuse	+	++
	Couche granuleuse	+	-
	Couche cornée	-	-
DERME	Fibroblastes	++	-
GLANDES SEBACEES	Cellules basales	++	+
	Cellules glandulaires	++	-
GLANDES SUDORALES ECCRINES	Canal excréteur	-	-
	Cellules sécrétrices	++	-
	Cellules myoépithéliales	++	+
FOLLICULE PILEUX	Papille dermique	+	+ ?
	Cellules de la matrice	++	+
	Gaine épithéliale interne	±	+++
	Gaine épithéliale externe	++	-
	Muscle arrecteur	+	-

10 D'autres pathologies, de type dermatologique, peuvent être observées chez l'homme ou la femme comme résultant d'une suractivité de la 5 α -réductase à savoir, en particulier l'acné, l'hirsutisme ou encore l'alopecie.

Dans la peau, l'activité de la 5 α -réductase est plus importante dans la glande sébacée que dans les autres structures. Par ailleurs, les glandes séborrhéiques montrent une activité 5 α -réductase plus importante que celles des autres territoires

cutanés. Par conséquent, le niveau de sécrétion sébacée physiologique semble étroitement lié à l'activité de cette enzyme.

Chez l'acnéique, il existe une hyperactivité de la 5α -réductase. Plus qu'une augmentation des taux sériques des androgènes, c'est une augmentation des précurseurs en DHT, facteur principal de la fonction sébacée, qui participent à l'acné.

La peau grasse ou (séborrhée), outre son aspect disgracieux, constitue un terrain sur lequel peuvent survenir des complications. Elle atteint les zones où les glandes sébacées sont nombreuses et résulte principalement d'une surstimulation androgénique de la production sébacée par ces glandes spécifiques. L'hyper-séborrhée participe à la survenue des lésions d'acné vulgaire.

Dans le cuir chevelu, on retrouve l'isoenzyme de type 1 de la 5α -réductase au niveau des glandes sébacées, ainsi qu'au niveau du follicule pileux. L'isoenzyme de type 2 de la 5α -réductase est localisée majoritairement au niveau de la gaine épithéliale interne, ainsi qu'au niveau de la papille dermique du cheveu. Cependant cette dernière localisation reste à préciser.

L'alopecie androgénique, dont la physiopathogénie est très voisine de celle de l'acné, est la plus fréquente des alopecies et sans doute celle où la demande de thérapeutique est la plus forte. La 5α -réductase semble jouer un rôle primordial dans cette pathologie. En effet, les hommes atteints d'un déficit génétique en isoenzyme de type 2 de la 5α -réductase ne développent pas d'alopecie androgénique.

Compte tenu de ce qui précède, la recherche s'est orientée vers la mise au point d'inhibiteurs de la 5α -réductase. Certains stéroïdes comme la progestérone ont été testés dans ce sens, mais sa métabolisation rapide la rend inefficace *in vivo*. Pour être actif, l'inhibiteur de 5α -réductase doit être suffisamment stable pour bloquer l'activité de l'enzyme *in vitro*. Le finastéride, inhibiteur compétitif stéroïdien, rempli cette condition, mais il est plus actif sur l'isoenzyme de type 2 que sur l'isoenzyme de type 1 et ces deux isoenzymes n'ont que 50 % d'homologie sur la séquence de leurs acides aminés. C'est donc surtout dans l'hyperplasie bénigne de la prostate que le finastéride a déjà été testé.

Par ailleurs, on connaît également l'extrait de *Serenoa Repens*, comme référence en tant qu'inhibiteur de la 5α -réductase, l'extrait de *Serenoa Repens*

présentant l'avantage, par rapport au finastéride, d'une origine naturelle en tant qu'extrait végétal permettant une meilleure comparaison pour des produits testés également d'origine naturelle. *Serenoa Repens*, également connu sous la dénomination *Sabal serrulatum*, est un petit palmier que l'on peut trouver aux Etats-
5 Unis (Floride) en Afrique du Nord et en Espagne.

On a maintenant trouvé de manière tout à fait surprenante et inattendue que l'utilisation de certains composés d'origine végétale permet d'obtenir un effet remarquable d'inhibition de l'activité de la 5 α -réductase procurant ainsi notamment une nouvelle réponse pour le traitement des pathologies et/ou désordres
10 dermatologiques évoqués ci-dessus.

La présente invention se rapporte ainsi à l'utilisation d'au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 α -réductase.

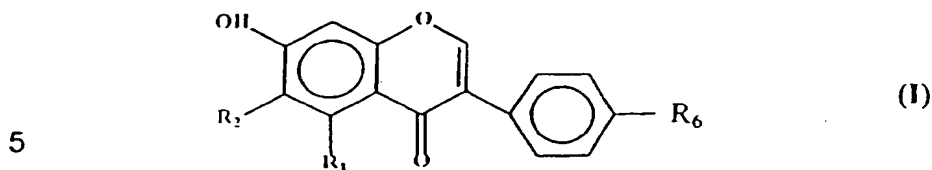
15 Selon l'invention, l'expression "et les mélanges de ces derniers" ci-dessus englobe bien entendu en particulier des mélanges d'isoflavones, des mélanges d'extraits de prunier d'Afrique ou encore des mélanges d'isoflavones(s) et d'extrait(s) de prunier d'Afrique.

En particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la
20 composition est destinée à inhiber l'isoenzyme de type 1 et/ou l'isoenzyme de type 2 de la 5 α -réductase.

Les isoflavones utilisables selon l'invention peuvent être obtenues par synthèse chimique ou sont des substances naturelles extraites de produits naturels, notamment à partir des végétaux.

25 On distingue les formes aglycones des isoflavones et les formes glycosylées de ces dernières. Ces diverses formes sont illustrées par les formules suivantes.

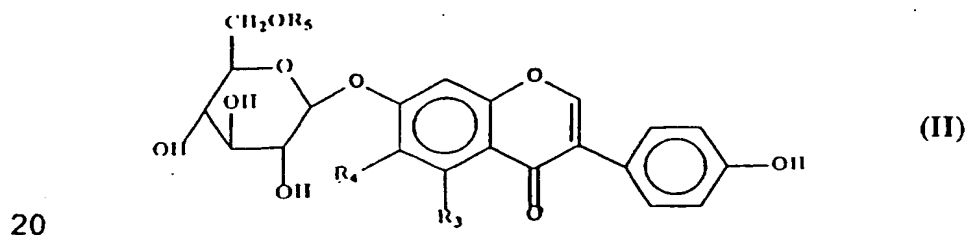
Formes aglycones, de formule :



dans laquelle R1 et R2 représentent :

	R1	R2	R6	Nom du composé
	H	H	OH	Daidzeine
10	OH	H	OH	Genisteine
	H	OCH ₃	OH	Glyciteine
	H	H	OCH ₃	Formononectine
	OH	H	OCH ₃	Biochanine A

15 Formes glycosylées, de formule :



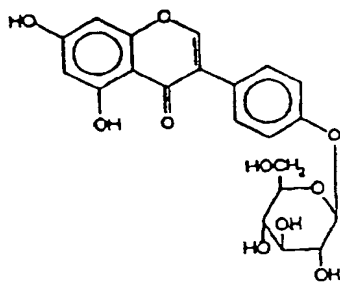
dans laquelle R3, R4 et R5 représentent :

	R3	R4	R5	Nom du composé
	H	H	H	Daidzine
	OH	H	H	Genistine
25	H	OCH ₃	H	Glycitine
	H	H	COCH ₃	Acetyldaidzine
	OH	H	COCH ₃	Acetylgenistine
	H	OCH ₃	COCH ₃	Acetylglycitine
	H	H	COCH ₂ COOH	Malonyldaidzine
30	OH	H	COCH ₂ COOH	Malonylgenistine
	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH	Malonylglycitine

On peut encore citer :

- la génistéïn-4'-O-glucoside de formule :

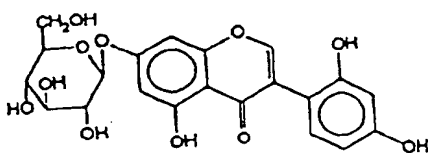
5



(III)

- la 2'-hydroxygénistéïn-7-O-glucoside de formule :

10

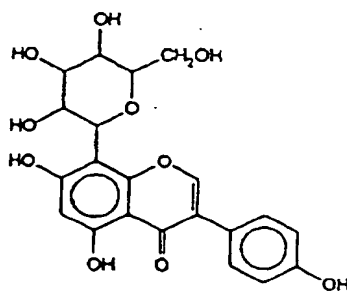


(IV)

15

- la génistéïn-C-8-glucoside de formule :

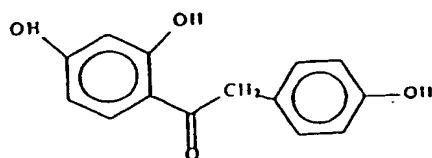
20



(V)

- la 2, 4, 4'-trihydroxydeoxybenzoïne (THB) de formule :

25



(VI)

30

Les formes glycosylées des isoflavones sont hydrolysées sous l'action des béta-glucosidases. Les formes glycosylées (daidzine et génistine) et acylées sont les plus abondantes. Une hydrolyse acide chimique ou enzymatique peut transformer ces formes conjuguées en daidzéine et genistéine, plus absorbables.

- 5 L'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les isoflavones synthétiques ou d'origine naturelles, du groupe constitué par les génistine, daidzine, glycitine, acétyldaidzine, acétylgenistine, acétylglycitine, malonyldaidzine, malonylgenistine, malonylglycitine, la 2,4,4'-trihydroxydeoxybenzoïne (THB), la daidzéine, la génistéine, la glycitéine, la 10 formononectine, la biochanine A, la génistéin-4'-O-glucoside, la 2'-hydroxygénistéin-7-O-glucoside, la génistéin-C-8-glucoside, et les mélanges de ces derniers.

On préfère tout particulièrement utiliser selon l'invention un produit choisi dans le groupe constitué par la génistine, la génistéine et les mélanges de ces derniers.

- 15 On ne connaît pas de sources naturelles aussi riches en isoflavones que le soja. Les méthodes de purification des isoflavones à partir de produits du soja, notamment les graines, les germes de soja (ou "soja germé"), les laits de soja dont broyats et mélasses et les produits fermentés (en particulier Tofu et Tempeh) sont bien connues de l'homme du métier.

- 20 Le tableau 2 suivant illustre les teneurs en isoflavones (microgrammes/gramme) dans des graines de soja de récoltes de l'Iowa (Wang et Murphy, "Isoflavone composition of American and Japanese Soybeans in Iowa : effects of variety, crop year, and location", J. Agric. Food Chem. 1994, 42, 1674-1677).

25

Tableau 2 : exemple de teneurs en isoflavones dans des graines de soja

Formes aglycones	µg/g d'extrait sec.
Daidzeine	7-60
Genisteine	17-56
Glyciteine	20-24
Formes glycosylées	
Daidzine	180-780
Genistine	325-850
Glycitine	53-70
6"-O-malonyldaidzine	121-410
6"-O-malonylgenistine	290-958
6"-O-malonylglycitine	61-72
6"-O-acetyldaidzine	tr
6"-O-acetylgenistin	2-10
6"-O-acetylglycitine	23-36

Le soja germé est la source de soja la plus riche en isoflavones.

- Concernant le lait de soja, il est traditionnellement obtenu à chaud par
- 5 broyage des graines après dépelliculage, en milieu alcalin. Un traitement thermique est effectué pour inhiber les facteurs antitrypsiques.

Les quantités d'isoflavones présentes dans les laits de soja sont variables. Le tableau 3 suivant est une illustration des teneurs en isoflavones des laits de soja.

Tableau 3 : exemple de teneurs en isoflavones dans des laits de soja

Formes aglycones	$\mu\text{g/g}$ d'extrait sec.	mg/l de soja
Daidzeine	18	1,4
Genisteine	19	1,5
Glyciteine	10	0,8
Formes glycosylées		
Daidzine	410	33
Genistine	710	57
Glycitine	65	5
6"-O-malonyldaidzine	690	55
6"-O-malonylgenistine	871	70
6"-O-malonylglycitine	39	3
6"-O-acetyldaidzine	22	18
6"-O-acetylgenistine	820	66
6"-O-acetylglycitine	89	7

Les broyats ou mélasses résultant de la production du lait de soja
5 représentent également une source d'isoflavones de soja.

Par "extraits d'isoflavones de soja", on entend ainsi selon l'invention les
extraits d'isoflavones de soja obtenus à partir des différents produits du soja décrits
ci-dessus (graines, germes de soja (ou "soja germé"), les laits de soja dont broyats et
mélasses et les produits fermentés (en particulier Tofu et Tempeh)), extraits qui ont
10 éventuellement été purifiés et/ou concentrés pour augmenter leurs teneurs en
isoflavones, selon des méthodes bien connues de l'homme du métier.

L'utilisation selon l'invention est ainsi également caractérisée en ce que ledit
produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du soja.

On peut en particulier citer l'extrait d'isoflavones de soja commercialisé par la
15 Société Nutrinov sous la dénomination Genosten 4000^R. Il s'agit d'un extrait soluble
de soja enrichi en isoflavones obtenu après concentration par évaporations

successives des mélasses de soja. Ce procédé ne fait appel à aucun solvant organique. On trouvera des données analytiques sur ce produit dans les exemples ci-après.

Le lupin (*lupinus*) est également une source naturelle intéressante en isoflavones. On peut citer en particulier la variété du "lupin jaune" dans les tiges duquel ont notamment été identifiées les isoflavones glycosylées génistine, 2'-hydroxygénistéin-7-0-glucoside, génistéin-4'-0-glucoside et la génistéin-C-8-glucoside dont les formules respectives sont décrites ci-dessus (Rafal Franski et al, "Application of mass spectrometry to structural identification of flavonoid monoglycosides isolated from shoot of lupin (*lupinus luteus L.*)", Acta Biochimica Polonica, vol. 46, N° 2/1999, 459-473).

L'utilisation selon l'invention est ainsi également caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du lupin c'est-à-dire, par analogie avec la définition ci-dessus pour les extraits d'isoflavones du soja, parmi les extraits d'isoflavones pouvant être obtenus à partir des produits du lupin.

Les extraits de prunier d'Afrique ou "*Pygeum Africanum*" sont bien connus de l'homme du métier. Ils sont principalement issus de l'écorce du prunier d'Afrique. Il s'agit d'extraits stéroliques de prunier d'Afrique, tels que ceux commercialisés par les sociétés Euromed et Indena sous les dénominations respectives "*Pygeum*" et "*Prunus Africana*". Des caractéristiques physico-chimiques de ces deux extraits sont données dans les exemples ci-après.

On utilise en particulier selon l'invention le produit tel que décrit ci-dessus, sous forme d'isoflavone(s) de soja, d'extrait(s) de prunier d'Afrique ou d'un mélange de ces derniers, selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids (utilisation sous forme pure possible dudit produit), de préférence entre environ 0,01 et environ 70 % en poids, et plus particulièrement encore entre environ 0,1 et 10 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

La composition préparée par l'utilisation selon l'invention peut en outre comprendre un excipient pharmaceutiquement, dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable. On peut utiliser tout excipient adapté pour les formes galéniques connues de l'homme de métier, en vue d'une administration par voie topique, orale, entérale ou parentérale, notamment rectale.

En particulier, cet excipient peut être adapté pour l'obtention d'une composition sous forme d'une solution huileuse, d'une émulsion eau-dans-huile, une émulsion huile-dans-eau, une microémulsion, un gel huileux, un gel anhydre, une crème, une dispersion de vésicules, de microcapsules ou de microparticules, ou encore de gellules ou de capsules molles de gélatine ou végétales.

De préférence, on utilise un excipient adapté pour une administration par voie topique externe ou par voie rectale.

L'effet avantageux d'inhibition de l'activité de la 5 α -réductase fourni par l'utilisation selon l'invention permet de destiner la composition ainsi préparée à des traitements thérapeutiques, notamment dermatologiques, et cosmétiques.

Ainsi, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement des pathologies et/ou des désordres cutanés liés à une exagération congénitale ou acquise de l'activité de la 5 α -réductase.

En particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hypertrophie prostatique.

En outre, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'adénome prostatique.

L'utilisation d'un excipient adapté pour une administration par voie rectale comme décrit ci-dessus peut être particulièrement envisagée pour ces traitements de l'hypertrophie et/ou de l'adénome prostatique.

L'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'acné.

L'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hyper séborrhée.

Enfin, l'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'alopecie.

L'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hirsutisme.

La présente invention a encore pour objet une méthode de traitement cosmétique de la peau grasse, caractérisée en ce qu'on applique sur la peau une composition cosmétique contenant au moins un produit choisi dans le groupe

constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, tels que décrits ci-dessus.

L'invention a par ailleurs pour objet une méthode de traitement cosmétique de la chute des cheveux, caractérisée en ce qu'on applique sur le cuir chevelu une
5 composition cosmétique contenant au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, tels que décrit ci-dessus.

Enfin, l'invention a également pour objet une méthode de traitement cosmétique de l'excès de pilosité, caractérisée en ce qu'on applique sur les zones de
10 la peau présentant des excès de pilosité une composition cosmétique contenant au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, tels que décrits ci-dessus.

En effet, à l'opposé des traitements médicaux hormonaux, ces deux dernières méthodes de traitement cosmétique permettent d'améliorer l'apparence en réduisant
15 de manière visible les phénomènes disgracieux de chute de cheveux liés à l'alopecie et les phénomènes d'excès de pilosités liés à l'hirsutisme.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de ces méthodes de traitements cosmétiques, ledit produit est présent dans la composition selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids (utilisation sous forme pure
20 possible, sans excipient), de préférence entre environ 0,01 et environ 70 % en poids, et plus particulièrement encore entre environ 0,1 et 10 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

Avantageusement, la composition cosmétique appliquée selon la méthode cosmétique de l'invention contient en outre au moins un excipient cosmétiquement
25 acceptable tel que décrit ci-dessus.

Enfin, l'invention a encore pour objet l'utilisation d'au moins un composé choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, tels que décrits ci-dessus, en tant qu'additif dans un aliment pour l'être humain et/ou l'animal. Cette utilisation alimentaire est de
30 préférence caractérisée en ce que ledit additif est présent dans l'aliment selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids, de préférence

entre environ 0,01 et environ 70 % en poids, et plus particulièrement encore entre environ 0,1 et 10 % en poids, par rapport au poids total de l'aliment.

Les exemples suivants sont destinés à illustrer la présente invention et ne doivent en aucun cas être interprétés comme pouvant en limiter la portée.

5 A moins qu'il n'en soit précisé autrement, les pourcentages indiqués dans les exemples suivants sont des pourcentages en poids.

Exemple 1 : Evaluation de l'activité inhibitrice sur l'activité de la 5 α -réductase par mesure du taux de 5-dihydrotestostérone formée à partir de la
10 **testostérone par les cellules DU145.**

1. Matériel et méthodes

1.1 Matériel

15 Les cellules prostatiques DU145 sont issues d'une lignée tumorale obtenue à partir d'un carcinome de la prostate (N° ATCC HTB 81). Le milieu MEM (réf.0410265), la glutamine et la gentamycine viennent de chez Gibco. Le sérum de veau fœtal (SVF) vient de chez DAP et est utilisé décomplémenté (45 mm à 56°C). les plastiques servant à la culture (boîtes et plaques) viennent de chez Costar. La testostérone vient de chez Sigma.

20

1.2 Méthode

1.2.1 Préparation des gammes de produits

Une solution mère en éthanol à 10 mg/ml est préparée à partir de chacun des produits testés.

25

La gamme de concentration utilisée pour les expériences est la suivante : 0, 5, 10, 50, 100 et 500 microgrammes/ml. (Dilution effectuée dans le milieu de culture). Le volume d'extrait ajouté par puits étant de 20 microlitres/puits, les solutions à préparer sont concentrées 50X.

30

Préparation de la Testostérone

Une solution mère de testostérone à 10 mM est préparée dans l'éthanol. Au moment de son utilisation, cette solution est diluée au 1:1000 dans le milieu de culture et 10 microlitres sont ajoutés par puits.

5

1.2.2. Expérience d'inhibition de la 5 α -réductase des DU 145

Les cellules prostatiques DU145 sont cultivées à 37°C, 5% CO₂ dans un milieu MEM contenant de la glutamine (2mM), de la gentamycine (50 microgrammes/ml) et 10% de SVF. Leur taux de sous-culture est de 1:10.

10

Avant de lancer l'expérimentation, les cellules sont mises en culture dans des plaques 6 puits à raison de $2 \cdot 10^5$ DU145 par puits/1 ml de milieu ne contenant que 1% de SVF. Les cellules sont maintenues 3 jours à 37°C, 5% CO₂. Le jour de l'expérience, le milieu de culture contenu dans les puits est éliminé et remplacé par du milieu neuf contenant 1% de SVF. La testostérone (0,1 micromolaire final) ainsi que les extraits aux différentes concentrations sont ajoutés au milieu à raison de 10 et 20 microlitres/puits respectivement. (Les puits "contrôles" correspondent à des cellules incubées en présence de testostérone et d'un équivalent Ethanol. Ceci permet de soustraire l'effet du solvant sur les cultures et de déterminer le pourcentage de DHT formée en absence d'inhibiteur). Les cellules sont alors incubées à 37°C, 5% CO₂. Au bout de 3 heures, les surnageants de culture sont collectés et congelés à -80°C jusqu'au dosage.

15

20

Mesure du taux de DHT formée

Principe: extraction des produits lipophiles par l'éther, concentration des échantillons en DIIT par chromatographie d'affinité et dosage radio-immunologique

25

Préparation des échantillons

- Après avoir agité au vortex les prélèvements, introduire les échantillons dans des flacons "SEPEX"

30

- Ajouter dans chaque tube 0,1 ml de la solution radioactive "3H-Rdt" (pour évaluation du rendement d'extraction). Boucher les flacons, les agiter un par un au vortex.

- Laisser reposer 30 min à température ambiante. Puis agiter de nouveau chaque flacon au vortex.
- Ajouter dans chaque flacon : 5 ml d'éther éthylique.
- Boucher les flacons et les agiter manuellement de façon énergique. Laisser décanter quelques minutes.
- 5 - Congeler les phases aqueuses à -30°C, pendant au moins 1 heure.
- Recueillir la phase étherée dans un tube à essai en boro-silicate de 5 ml correspondant.
- Evaporer totalement la phase étherée à l'aide du système évaporateur + bain-marie à 10 37°C.

Séparation de la DHT

- Préparation des colonnes : Préparer les colonnes dans des pipettes de culture en verre de 5 ml avec 10 cm de chromatolithe A.
- 15 • Rinçage des colonnes : 3 ml d'iso-octane pur combitips (3 fois), en laissant couler par simple gravité.
- Elution des extraits étherés secs
 - Chaque extrait sec est repris par 1 ml d'iso-octane pur, vortexer vigoureusement. Attendre 15 min à température ambiante. Réagiter au vortex.
 - 20 - Lorsque les 3 ml d'iso-octane (lavage des colonnes) sont élués, transvaser les extraits étherés secs repris par l'iso-octane sur la colonne. Laisser éluer.
 - Rincer chaque tube "extrait sec" avec 1 ml d'iso-octane pur combitips, vortexer vigoureusement. Attendre 15 min à température ambiante. Réagiter au vortex et transvaser dans la colonne comme précédemment.
 - 25 - Laver par 4 ml d'iso-octane pur.
- Recueil de la DHT
 - Préparer le solvant d'élution (mélange à 6% iso-octane/acétate d'éthyl: 94/6 (v-v))
 - Eluer par 6 ml (pipette) de ce mélange.
 - Recueillir l'éluat DHT dans les tubes à essais en boro-silicate de 5 ml identifiés.
 - 30 • Traitement de l'éluat DHT : Evaporer le solvant de l'éluat à l'aide du système évaporateur-bain-marie (37°C)

Dosage RIA

- Protocole de distribution : Reprendre les échantillons par 0,5 ml de tampon RC, le Blanc par 1 ml de tampon Rcet, les Contrôles par 0,5 ml de tampon RC. Placer à l'étuve à 37°C 15 min Agiter de nouveau les tubes au sortir de l'étuve (1 min).
- 5
- Dans des tubes à hémolyse en verre identifiés de 5 ml, mettre dans l'ordre:
- * **Tampon** : Activité Totale (AT): 0,7 ml de tampon RC, Activité Non Spécifique (N): 0,2 ml de tampon RC, Gamme : seul le point 0 de la gamme (noté B0) comporte 0,1 ml de tampon RC,
- 10
- * **Solution étalon** (1000 à 7,8 pg/tube) : 0,1 ml de la solution étalon respective.
 - * 0,1 ml d'extrait sec repris dans le tampon
 - Puis, distribuer l'**anti-sérum** : 0,1 ml dans tous les tubes sauf AT et N.
 - Puis, distribuer la **solution de dosage "3HD"** : 0,1 ml dans tous les tubes.
 - Vortexer et recouvrir d'un parafilm.
- 15
- Incubation à 4°C, pendant 1h30 minimum (24 h. maximum).
 - Préparation du charbon-dextran : Mettre la suspension de charbon-dextran dans un bécher, puis, dans un bain d'eau glacé à 4°C, pendant au moins 1h30.
 - Rendement de purification en DHT
 - Dans 6 petites fioles à scintillation (3 par série) déposer : 0,4 ml de tampon RC + 0,1 ml de la solution "3H-Rdt" (flacon du premier jour au réfrigérateur). Blancs : mettre 0,5 ml d'extrait sec reconstitué pour le blanc. Echantillons et contrôles : mettre 0,25 ml de tampon RC + 0,25 ml d'extrait.
- 20
- Ajouter 5 ml de liquide à scintillation dans toutes les fioles.
- 25
- Séparation de la DHT libre de celle liée à l'anticorps
- Mettre la suspension de charbon-dextran sous agitation magnétique, dans une bassine d'eau glacée.
 - Ajouter 0,5 ml de charbon-dextran dans tous les tubes sauf AT en 2 min maximum.
 - Vortexer, remettre les tubes dans l'eau glacée. Attendre 10 min exactement.
- 30
- Centrifuger à 4°C, 3400 rpm, pendant 11 min

- Pipeter 0,5 ml de chaque surnageant (y compris AT) dans une petite fiole de comptage
 - Ajouter 5 ml de liquide scintillant. Agiter, laisser s'équilibrer 30 min à température ambiante.
- 5 - Mettre a compter 2 min avec le compteur β (Beckman, LS 6000 SE).

2. Bulletins analytiques des produits testés

2.1. L'extrait d'isoflavones de soja testé, dénommé Genosten 4000, a été fourni par la société Nutrinov.

10

Description : Extrait soluble de soja enrichi en isoflavones obtenu par une technique d'extraction physique, sans utilisation de solvants organiques.

Caractéristiques physico-chimiques :

Densité	400 g/l
Humidité	< 5 %
PH (solution aqueuse à 4%)	8
Solubilité dans l'eau	100 %

15

Composition :

Protéines	11 %
Lipides	< 0.5 %
Glucides	60 %
Sodium	1500 mg/100g
Calcium	< 100 mg/100g
Potassium	5500 mg/100g
Phosphore	300 mg/100g

Composition en isoflavones :

Teneur totale en isoflavones :	4000 +/- 200 mg/100 g
Profil type :	
Daidzine	200
Genistine	280
Malonyldaidzine	900
Malonylgénistine	2080
Daidzéine	30
Génistéine	10

2.2. L'extrait de *Pygeum Africanum* testé a été fourni par la société Euromed.

5 *Description* : Extrait lipido-stérolique de *Pygeum Africanum* issu de l'écorce de pygeum.

Caractéristiques physico-chimiques :

Aspect	pâte visqueuse de couleur marron prononcé, avec une odeur caractéristique
Solubilité	Insoluble dans l'eau, soluble dans le chloroforme
Perte à la dessiccation	3 % max.
Cendres	0.4 % max.
Absorption UV	Maxima à 242 ; 282 et 320 nm

Composition chimique

Indice d'acide 39 mg KOH/g

Composition en acides gras (%)

C12:0	0.3
C16:0	44.6
C18:0	5.6
C18:1	36.6
C18:2	9.8
C18:3	0.6

Teneur en insaponifiable 17.6 %

Stérols 14.7

3. Résultats - Evaluation de la conversion de la testostérone en 5-dihydrotestostérone par les cellules DU 145 – Détermination des IC 50

Tableau 4

Produit testé	IC 50 (µg/ml)
Extrait d'isoflavones de soja (Genosten 4000)	71
Extrait de Pygeum Africanum	203
Sereoa repens	60

5

4. Conclusions

L'extrait de serenoa Repens, choisi comme substance de référence, inhibe l'activité de la 5-alpha réductase. Ce résultat valide donc le test.

L'extrait d'isoflavones de soja, faiblement chargé en isoflavones (4 %), est aussi actif que l'extrait de serenoa Repens, choisi comme substance de référence inhibitrice de l'activité de la 5-alpha réductase.

L'extrait de Pygeum Africanum testé est actif dans l'inhibition de la 5-alpha réductase.

Exemple 2 : Evaluation in vitro de l'activité de la 5- α réductase sur la conversion de la testostérone en 5 α -dihydrotestostérone dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux.

20

Abréviations utilisées dans ce qui suit :

- ³H : tritium
- CCM : chromatographie en couche mince
- Ci : Curie
- DMSO : diméthyl sulfoxyde
- M199 : appellation donnée à un milieu de culture standard

25

- MCF : milieu de culture des fibroblastes
- MEM : appellation donnée au milieu de culture, *Minimum Essential medium*
- MIF : milieu d'incubation des fibroblastes
- 5 Rf : facteur de rétention relatif
- SVF : sérum de veau fœtal
- 5 α -DHT : 5 α -dihydrotestostérone

10 On se propose d'évaluer l'effet des produits tels qu'un extrait d'isoflavones de soja (Genosten 4000, décrit ci-dessus), de la génistéine et de la génistine (isoflavones purifiées, produits commerciaux Sigma), d'un extrait de *Pygeum Africanum*, d'un extrait de *Serenoa Repens* choisi comme référence, sur l'activité de la 5 α -réductase. Un modèle *in vitro* de cultures de fibroblastes dermiques humains normaux a été retenu.

15

1. Matériels et méthodes

1.1 Produits à l'essai, produit de référence, et réactifs

Les produits à l'essai ont été fournis par EXPANSCIENCE et ont été conservés à +4°C jusqu'au moment de leur utilisation.

20 La testostérone radioactive (marquée au tritium en position 1, 2, 6 et 7, activité spécifique 79 Ci/mmol) était fournie par AMERSHAM, la testostérone non-radiomarquée était fournie par SIGMA.

Les réactifs de qualité analytique, provenaient de chez SIGMA, MERCK, BDH, ALDRICH ou CARLO ERBA sauf indication contraire.

25

1.2 Système d'essai

Le milieu de culture des fibroblastes (MCF) était constitué par du MEM/M199 (3:1, v/v) additionné de pénicilline (50 UI/ml), de streptomycine (50 μ g/ml), de bicarbonate de sodium (0,2 %, p/v) et de SVF (10 %, v/v).

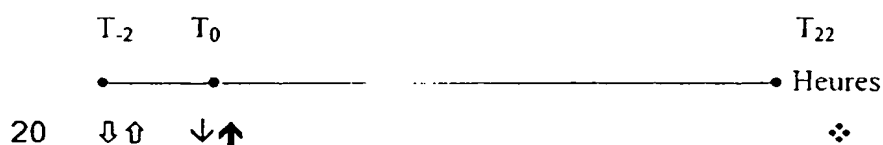
Le système d'essai était constitué de fibroblastes dermiques humains normaux cultivés en monocouche. Les fibroblastes ont été isolés à partir d'un résidu de plastie abdominale réalisée chez une femme de 51 ans (sujet BIOPREDIC n°10013). Les cellules ont été utilisées au cinquième passage, elles ont été cultivées jusqu'à confluence des monocouches dans le milieu MCF à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

1.3 Préparation des produits et incubation avec le système d'essai

Le milieu d'incubation des fibroblastes (MIF) était constitué de MCF additionné de testostérone tritiée ($1,6 \times 10^{-7}$ M, soit 6,32 µCi/ml) et de testostérone non radiomarquée ($3,84 \times 10^{-6}$ M).

Les produits à l'essai et le finastéride ont été repris dans du DMSO avant d'être dilué dans le milieu d'incubation. La concentration finale en DMSO a été maintenue constante et égale à 1% (v/v) dans chaque dilution de produits à l'essai et de produit de référence.

Echelle de temps :



- ↕↕: élimination du milieu MCF
- ↕↕: pré-incubation des produits à l'essai et du produit de référence préparés dans le milieu MCF
- ↓: élimination des milieux MCF contenant les produits à l'essai ou le produit de référence
- ↑: incubation des produits à l'essai et du produit de référence préparés dans le milieu MIF
- ❖: détermination de l'activité de la 5α -réductase

Les cultures de fibroblastes ont été pré-incubées en présence des produits à l'essai ou du produit de référence pendant 2 heures avant l'ajout du substrat, la

testostérone. Pour cette étape, les produits à l'essai et le produit de référence ont été préparés dans le milieu MCF.

Après la pré-incubation, les cultures de fibroblastes ont été incubées en présence des produits à l'essai ou du produit de référence préparés dans le milieu MIF pendant 22 heures (ou 24 heures, indiqué avec les résultats) à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Des cultures témoins ont été incubées dans le milieu MIF en absence de produits à l'essai et de produit de référence. Des cultures «témoin DMSO» ont été incubées dans le milieu MIF contenant 1% (v/v) de DMSO.

10 Chaque condition expérimentale a été testée en triplicate.

1.4 Evaluation des effets

Après la période d'incubation, les cellules ont été soumises à l'action des ultrasons dans le milieu MIF. Les lysats cellulaires ainsi obtenus ont été extraits par du dichlorométhane. Après évaporation, les résidus secs ont été repris dans du méthanol et ont été déposés sur des plaques de silice 60F₂₅₄ (MERCK, référence 5554).

Des standards non radiomarqués, la testostérone, la 5 α -dihydrotestostérone et l'androstènedione, ont été déposés sur chacune des plaques.

Le solvant de migration était un mélange de dichlorométhane et d'éther (7:3, v/v) A la fin de la migration, les plaques de silices ont été lues à l'aide d'un scanner de radioactivité BERTHOLD.

Les standards non radiomarqués ont été mis en évidence par pulvérisation d'acide sulfurique à 5 % (v/v) sur les plaques de chromatographie chauffées ensuite à 100°C pendant 10 minutes.

La comparaison des Rf (facteur de rétention relatif) déterminés pour les standards avec ceux obtenus pour les différents métabolites radioactifs a permis l'identification de ces derniers.

30 La métabolisation de la testostérone en 5 α -dihydrotestostérone dans les différentes conditions expérimentales a été calculée : les résultats (aires des pics de

5 α -dihydrotestostérone comptés par le scanner BERTHOLD) ont été exprimés en pmoles de 5 α -dihydrotestostérone formées par puits de culture. Ils ont aussi été exprimés en pourcentage de l'activité 5 α -réductase présente dans le groupe 'témoin DMSO'.

5

2.5 - Traitement des données

Les groupes de données (groupe témoin et groupes traités) ont été traités par une analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1, $p < 0,05$), suivie par un test de DUNNETT ($p < 0,05$). L'effet des produits à l'essai et du produit de référence a été comparé au groupe 'témoin DMSO'. Les effets des produits à l'essai ont été comparés entre eux par une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA 2, $p < 0,05$, facteur 1 = concentration et facteur 2 = traitement).

10

2. Résultats et discussion

15

On se reportera au paragraphe 3 suivant pour les tableaux de résultats détaillés.

2.1. Génistéine et génistéine

20

Dans les échantillons 'témoin DMSO' (0,1% v/v), la vitesse de métabolisation de la testostérone était de 11,40 +/- 0,75 pmoles de 5 α -DHT formées en 24 heures par puits de culture (tableau paragraphe 3.1). Cette vitesse était conforme aux résultats déjà obtenus au laboratoire.

25

La génistéine, testée à 0,1 ; 1 et 10 $\mu\text{g/ml}$, n'avait pas d'effet d'inhibition significatif ($p < 0,05$) sur l'activité de la 5 α -réductase. A 100 $\mu\text{g/ml}$, ce produit inhibait significativement ($p < 0,05$) de 32% l'activité de la 5 α -réductase.

La génistéine, testée à 0,1 ; 1 et 10 $\mu\text{g/ml}$, inhibait significativement ($p < 0,05$) de 32% ; 33% et 31% respectivement l'activité de la 5 α -réductase. A 100 $\mu\text{g/ml}$, 5il inhibait significativement ($p < 0,05$) de 61% l'activité de la 5 α -réductase.

En conclusion, la génistéine est nettement plus active que la génistéine.

30

2.2 Extrait d'isoflavones de soja

Dans les cultures témoins, la vitesse de métabolisation de la testostérone était de 9,71 +/- 0,77 pmoles de 5 α -DHT formées en 22 heures par puits de culture (tableau paragraphe 3.2). Cette vitesse était conforme aux résultats déjà obtenus au laboratoire.

L'extrait d'isoflavones de soja, testé à 10 et 100 μ g/ml, inhibait respectivement de 22 et 17% l'activité de la 5 α -réductase.

L'extrait de *Serenoa Repens*, testé à 10 et 100 μ g/ml, inhibait respectivement de 15 et 35% l'activité de la 5 α -réductase. A 1 μ g/ml, il n'avait pas d'effet.

En conclusion, dans les conditions expérimentales retenues, les extraits d'isoflavones de soja et de *Serenoa Repens* (référence) inhibaient l'activité de la 5 α réductase. L'extrait d'isoflavones de soja présente une activité d'inhibition de la 5 α réductase supérieure à celle de l'extrait de *Serenoa Repens*.

2.3. Extrait de *Pygeum Africanum*

Dans les cultures témoins, la vitesse de métabolisation de la testostérone était de 9,71 +/- 0,77 pmoles de 5 α -DHT formées en 22 heures par puits de culture (tableau paragraphe 3.3.). Cette vitesse était conforme aux résultats déjà obtenus au laboratoire.

Les effets des produits à l'essai ont été comparés à ceux obtenus en présence du finastéride, utilisé comme produit de référence en plus de l'extrait de *Serenoa Repens*.

Le finastéride, testé à 3 et 30 ng/ml, inhibait respectivement l'activité de la 5 α -réductase de 36 et 65% (tableau 1). Ce résultat était attendu et valide l'étude.

L'extrait de *Serenoa Repens*, testé à 10 et 100 μ g/ml, inhibait respectivement de 15 et 35% l'activité de la 5 α -réductase. A 1 μ g/ml, il n'avait pas d'effet (tableau 2).

L'extrait de *Pygeum Africanum*, testé à 1, 10 et 100 μ g/ml, inhibait respectivement de 33, 22 et 30% l'activité de la 5 α -réductase (tableau 2).

En conclusion, les extraits de *Serenoa Repens* et de *Pygeum Africanum* inhibaient de façon quasi identique l'activité de la 5 α réductase.

3. Tableaux de résultats détaillés

3.1. Effet de la génistine et de la génistéine sur l'activité de la 5 α -réductase dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux, après 24 heures d'incubation

5

Produit	DMSO 1% (v/v)	Concentration (μ g/ml)			
		0,1	1	10	100
Génistine	10,56	11,72	9,80	13,64	7,12
	12,00	11,16	9,88	14,12	8,84
	11,64	9,36	10,16	12,64	7,20
	11,40\pm0,75	10,75\pm1,23	9,95\pm0,19	13,47*\pm0,76	7,72*\pm0,97
	<i>100</i>	<i>94</i>	<i>87</i>	<i>118</i>	<i>68</i>
Génistéine	10,56	8,04	7,52	7,96	4,24
	12,00	7,52	8,56	8,68	4,96
	11,64	7,72	7,00	6,88	4,16
	11,40\pm0,75	7,76*\pm0,26	7,69*\pm0,79	7,84*\pm0,91	4,45*\pm0,44
	<i>100</i>	<i>68</i>	<i>67</i>	<i>69</i>	<i>39</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 α -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe 'DMSO 0,1% (v/v)'

* : moyenne significativement différente du groupe 'DMSO 0,1% (v/v)'

3.2 Effet des extraits de *Serenoa Repens* et d'isoflavones de soja (Genosten 4000) sur l'activité de la 5 α -réductase dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux après 22 heures d'incubation

5

Produit	DMSO	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	1% (v/v)	1	10	100
Serenoa Repens	8,00	7,72	6,84	5,48
	8,92	9,20	7,48	5,68
	8,68	8,08	7,52	5,44
	8,53\pm0,48	8,33\pm0,77	7,28\pm0,38	5,53\pm0,13
	<i>100</i>	<i>98</i>	<i>85</i>	<i>65</i>
Extrait d'isoflavones de soja (Genosten 4000)	8,00		6,24	7,04
	8,92		6,52	7,12
	8,68		7,12	7,12
	8,53\pm0,48		6,63\pm0,45	7,09\pm0,05
	<i>100</i>		<i>78</i>	<i>83</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 α -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe DMSO

* : moyenne significativement différente du groupe DMSO ($p < 0,05$)

10

3.3. Effet du finastéride et des extraits de *Serenoa Repens* et *Pygeum Africanum* sur l'activité de la 5 α -réductase dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux après 22 heures d'incubation

5

3.3.1. Finastéride

Témoin	DMSO 1% (v/v)	Finasteride (ng/ml)	
		3	30
9,24	8,00	5,52	2,92
9,28	8,92	5,84	2,92
10,60	8,68	5,00	3,00
9,71*\pm0,77	8,53\pm0,48	5,45*\pm0,42	2,95*\pm0,05
<i>114</i>	<i>100</i>	<i>64</i>	<i>35</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 α -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe DMSO

* : moyenne significativement différente du groupe DMSO ($p < 0,05$)

3.3.2. Extraits de *Serenoa Repens* et *Pygeum Africanum*

Produit	DMSO 1% (v/v)	Concentration (μ g/ml)		
		1	10	100
Serenoa Repens	8,00	7,72	6,84	5,48
	8,92	9,20	7,48	5,68
	8,68	8,08	7,52	5,44
	8,53 \pm 0,48	8,33 \pm 0,77	7,28* \pm 0,38	5,53* \pm 0,13
	<i>100</i>	<i>98</i>	<i>85</i>	<i>65</i>
Pygeum Africanum	8,00	5,00	6,36	5,84
	8,92	5,64	7,28	6,52
	8,68	6,40	6,20	5,60
	8,53 \pm 0,48	5,68* \pm 0,70	6,61* \pm 0,58	5,99* \pm 0,48
	<i>100</i>	<i>67</i>	<i>78</i>	<i>70</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 α -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe DMSO

* : moyenne significativement différente du groupe DMSO ($p < 0,05$)

Exemple 3 : composition d'un shampooing pour cheveux gras.

		%
5	Aqua	q.s.p. 100,000
	Sodium Lauroamphoacetate	14,000
	Coco-Glucoside	10,000
	Magnesium Laureth Sulfate	5,000
10	PEG-40 Glyceryl Cocoate	3,450
	PEG-150 Distearate	1,850
	Sodium Coceth Sulfate	1,050
	Citric Acid	0,450
	Disodium EDTA	0,300
15	Parfum	0,200
	Methylparaben	0,160
	Butylparaben	0,060
	Isoflavone de Soja	1,000
20	Pygeum Africanum	0,500

Exemple 4 : composition d'une émulsion pour peau grasse

		%
25	Aqua	q.s.p. 100
	Di-C12-13 Alkyl Malate	10,000
	Glycérine	5,000
	PEG-5 Glyceryl Stearate	3,500
	Glyceryl Stearate	1,500
30	Ceresin	1,500
	PEG-40 Stearate	1,500
	Sorbitan Stearate	1,000
	Zinc PCA	1,000
	Cetyl Alcohol	1,000
35	Polyacrylamide	1,000
	C13-14 Isoparaffin	0,500
	Parfum	0,500
	Piroctone Olamine	0,300
	Laureth-7	0,125
40	Sodium Polyacrylate	0,065
	Citrate de glycérides de palme hydrogénés	0,040
	Isoflavone de Soja	2,000

Exemple 5 : composition d'une émulsion pour peau grasse

		%
5	Aqua	q.s.p. 100
	Di-C12-13 Alkyl Malate	10,000
	Glycérine	5,000
	PEG-5 Glyceryl Stearate	3,500
	Glyceryl Stearate	1,500
10	Ceresin	1,500
	PEG-40 Stearate	1,500
	Sorbitan Stearate	1,000
	Zinc PCA	1,000
	Cetyl Alcohol	1,000
15	Polyacrylamide	1,000
	C13-14 Isoparaffin	0,500
	Parfum	0,500
	Piroctone Olamine	0,300
	Laureth-7	0,125
20	Sodium Polyacrylate	0,065
	Citrate de glycérides de palme hydrogénés	0,040
	Pygeum Africanum	1,000
	Acide Salicylique	1,000
25		
30		
35		

Revendications

1. Utilisation d'au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, pour la
5 préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 α -réductase.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition est destinée à inhiber l'isoenzyme de type 1 et/ou l'isoenzyme de type 2 de la 5 α -réductase.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le produit
10 est choisi parmi les isoflavones synthétiques ou d'origine naturelle.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les isoflavones synthétiques ou d'origine naturelles du groupe constitué par les génistine, daidzine, glycitine, acétyldaidzine, acétylgenistine, acetylglycitine, malonyldaidzine, malonylgenistine,
15 malonylglycitine, la 2,4,4'-trihydroxydeoxybenzoïne (THB), la daidzéine, la génistéine, la glycitéine, la formononectine, la biochanine A, la génistéin-4'-O-glucoside, la 2'-hydroxygénistéin-7-O-glucoside, la génistéin-C-8-glucoside et les mélanges de ces derniers.
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes,
20 caractérisée en ce que produit est choisi dans le groupe constitué par la génistine, la génistéine et les mélanges de ces derniers.
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du soja.
7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en
25 ce que le produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du lupin.
8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le produit est utilisé selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition préparée comprend un excipient pharmaceutiquement, dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable.

5 10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'excipient est adapté pour une administration par voie topique externe ou par voie rectale.

11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement des pathologies et/ou des désordres cutanés liés à une exagération congénitale ou acquise de l'activité de la 5α -réductase.

10 12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hypertrophie prostatique.

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'adénome prostatique.

15 14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'acné.

15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hyperséborrhée.

16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'alopecie.

20 17. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hirsutisme.

18. Méthode de traitement cosmétique de la peau grasse, caractérisée en ce qu'on applique sur la peau une composition cosmétique contenant au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 et 3 à 7.

25 19. Méthode de traitement cosmétique de la chute des cheveux, caractérisée en ce qu'on applique sur le cuir chevelu une composition cosmétique contenant au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 et 3 à 7.

30 20. Méthode de traitement cosmétique de l'excès de pilosité, caractérisée en ce qu'on applique sur les zones de la peau présentant des excès de pilosité une composition cosmétique contenant au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 et 3 à 7.

21. Méthode de traitement cosmétique selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, caractérisée en ce que ledit produit est présent dans la composition selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

5 22. Méthode selon l'une quelconque des revendications 18 à 21, caractérisée en ce que la composition cosmétique contient en outre au moins un excipient cosmétiquement acceptable.

10 23. Utilisation d'au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 et 3 à 7, en tant qu'additif dans un aliment pour l'être humain et/ou l'animal.

24. Utilisation selon la revendication 23, caractérisée en ce que le produit est présent dans l'aliment selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids, par rapport au poids total de l'aliment.

15

20

25



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche
voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2803747

N° d'enregistrement
national

FA 583255
FR 0000573

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 99 22728 A (ARCH DEV CORP ; LIAO SHUTSUNG (US); HIIPAKKA RICHARD A (US)) 14 mai 1999 (1999-05-14) * page 2, ligne 25 - page 3, ligne 30 * * revendications 1-7 * Tableau 1, (compounds 10,17) Tableau 7, (compounds 23,31) * page 10, ligne 1 - page 15, ligne 26 * * page 21, ligne 31 - page 22, ligne 4 *	1-5,8-24	A61K7/48 A61K7/06 A61K35/78 A61K31/353 A61P17/08 A61P17/14 A61P17/10
X	JP 10 059995 A (FUJIMOTO BROS:KK) 3 mars 1998 (1998-03-03) * abrégé *	1-3, 8-15,18, 21-24	
X	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1990-278125 XP002149039 "5-Alfa reductase inhibitors contg. iso:flavone cpd." & JP 02 193920 A (KAO CORPORATION) * abrégé *	1-3,8,9, 11, 14-18, 21-24	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) A61K
X	US 5 543 146 A (PEREZ CARLOS) 6 août 1996 (1996-08-06) * colonne 2, ligne 11-16 * * colonne 3, ligne 22-28 * * revendications; exemples *	1-3, 8-10,12, 13,22-24	
X	US 5 972 345 A (CHIZICK STEPHEN ET AL) 26 octobre 1999 (1999-10-26) * colonne 2, ligne 19-40; revendications *	1-3, 8-11,16, 19,21-24	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
3 octobre 2000		Veronese, A	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1

EPO FORM 1509 12/99 (P04CS6)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2803747

N° d'enregistrement
national

FA 583255
FR 0000573

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	<p>DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1986-129442 XP002149040 "Hair tonic preparation showing hair- growing effects containing extract bark prunus africana." & JP 61 068408 A (POLA KASEY KOGYO KK), 1986 * abrégé *</p>	<p>1-3, 8-11,16, 19,21-24</p>	
P,X	<p>SHIMIZU, KUNIYOSHI ET AL: "The 5.alpha.-reductase inhibitory components from heartwood of Artocarpus incisus. Structure-activity investigations" PLANTA MED. (2000), 66(1), 16-19 , XP000951500 * le document en entier *</p>	<p>1-3,8,9, 12-16, 19-22</p>	
			<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.Cl.7)</p>
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		3 octobre 2000	Veronese, A
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1509 12.99 (P04C35)

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 583255
FR 0000573

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche ou ont fait l'objet d'une recherche incomplète, à savoir:

Revendications ayant fait
l'objet de recherches incomplètes:
1-24

Raison:

Les définitions "isoflavones" et "prunier d'Afrique" présentes dans la revendication 1 ont trait à une très grande variété de composés/produits. Un fondement et/ou un exposé ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés/produits revendiqués. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux composés mentionnés dans la revendication 4, dans les description à la page 5-6 et aux extraits de prunier d'Afrique dénommés "Pygeum" et "Prunus Africana".

La définition "composition destinée à inhiber l'activité de la 5 alfa réductase" présente dans la revendication 1 ne définit pas les maladies pour lesquelles les compositions sont destinées. Par conséquent, la recherche a été limitée aux maladies mentionnés dans les revendications 12-20.